

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 13 août 2001 (13.08.01)	
Demande internationale no PCT/FR00/02523	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 1H23442C14FG
Date du dépôt international (jour/mois/année) 13 septembre 2000 (13.09.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 14 septembre 1999 (14.09.99)
Déposant GAUBERT, Sophie etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:
11 avril 2001 (11.04.01)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite
☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Eric LESOT (Fax 338.87.40) no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 1H23442C14FG	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 02523	Date du dépôt international (jour/mois/année) 13/09/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 14/09/1999
Déposant CAPSULIS		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que **certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche** (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a **absence d'unité de l'invention** (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No
PCT/FR 00/02523

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K9/127 A61K9/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BROWNLIE, ROBERT M., ET AL.: "Stimulation of secretory antibodies against Bordetella pertussis antigens in the lungs of mice after oral or intranasal administration of liposome incorporated cell-surface antigens" MICROBIAL PATHOGENESIS, vol. 14, no. 2, février 1993 (1993-02), pages 149-60, XP000920597 Aberdeen (GB)	1-9, 12, 15-19
Y	le document en entier	1-9, 12, 15-19
Y	FR 2 769 022 A (CAPSULIS) 2 avril 1999 (1999-04-02) cité dans la demande revendications 1-12	1-9, 12, 15-19
	-/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 avril 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18/04/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ventura Amat, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No
PCT/FR 00/02523

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X, P	<p>WO 00 37053 A (GENEREX PHARMACEUTICALS) 29 juin 2000 (2000-06-29) revendications 1,6,26,27 page 12, ligne 17 -page 13, ligne 7 -----</p>	<p>1-10,13, 18</p>

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02523

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2769022	A	02-04-1999	AU 9169798 A EP 1024830 A WO 9916468 A	23-04-1999 09-08-2000 08-04-1999
WO 0037053	A	29-06-2000	AU 1852000 A	12-07-2000

BEST AVAILABLE COPY

101069950
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

3

Applicant's or agent's file reference J23442-14WO.FG/LJ	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/02523	International filing date (day/month/year) 13 September 2000 (13.09.00)	Priority date (day/month/year) 14 September 1999 (14.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 9/00		RECEIVED AUG 01 2002
Applicant CAPSULIS		TECH CENTER 1600/2900

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 11 April 2001 (11.04.01)	Date of completion of this report 06 December 2001 (06.12.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02523

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-23, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.

☒ the claims, Nos. 1-19, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____.

☒ the drawings, sheets/fig 1/3-3/3, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

RECEIVED

AUG 01 2002

TECH CENTER 1600/2900

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____
☐ the claims, Nos. _____
☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02523

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 16-19

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 16-19
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See annex

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/02523

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III.

The present Authority considers that the subject matter of claims 16-19 is covered by the provisions of PCT Rule 67.1(iv). For this reason, no opinion will be given on the question of whether the subject matter of these claims is industrially applicable (PCT Article 34(4)(a)(i)).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/02523

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	11-14	YES
	Claims	1-10, 15-19	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-19	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

There are no uniform criteria in the PCT Contracting States for determining whether claims 16-19 are industrially applicable. Patentability may also be dependent on the way in which the claims are worded. Therefore, the European Patent Office does not consider the subject matter of use claims relating to the medical use of a compound to be industrially applicable. However, claims relating to a known compound, for a first medical use, will be accepted, as will claims relating to the use of such a compound for producing a drug with a view to a novel medical treatment.

Reference is made to the following documents:

D1: BROWNLIE, ROBERT M., ET AL.: 'Stimulation of secretory antibodies against Bordetella pertussis antigens in the lungs of mice after oral or intranasal administration of liposome incorporated cell-surface antigens' MICROBIAL PATHOGENESIS, vol. 14, no. 2, February 1993 (1993-02), pages 149-60, XP000920597 Aberdeen (GB)

D2: FR-A-2 769 022 (CAPSULIS) 2 April 1999 (1999-04-02) cited in the application

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Claim 1 defines a use of multilamellar vesicles having an onion-like structure which in turn has an internal liquid-crystal structure consisting of a stack of concentric bilayers based on amphiphilic agents alternated with layers of water, an aqueous solution or a polar liquid solution, and incorporating at least one antigen, for the preparation of a composition suitable for **mucosal administration**.

Document D1 describes multilamellar vesicles (abstract) incorporating an antigen (page 153, last paragraph and page 155) suitable for **nasal and oral administration**. Therefore, the subject matter of claim 1 is not novel (PCT Article 33(2)). The same applies to claims 2-10 and 15-19. The technical problem was that of developing novel adjuvants and vectors capable of inducing a systemic and mucous response in terms of protection against the pathogen.

Document D2 describes vesicles having the same structure as those used in the present application, and the use thereof for parenteral vaccination. It is obvious for a person skilled in the art starting with the information in documents D1 and D2 to use the vesicles having an onion-like structure and incorporating an antigen for mucosal administration (the combination of documents D1 and D2). Therefore, the subject matter of claims 1-19 does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/02523

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirement of PCT Rule 5.1(a)(ii), the relevant prior art disclosed in document D1 has not been indicated in the description, nor has this document been cited.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 10 DEC 2001

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL



(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire J23442-14WO.FG/LJ	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/02523	Date du dépôt international (jour/mois/année) 13/09/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 14/09/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A61K9/00		
Déposant CAPSULIS		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:
 - I ☒ Base du rapport
 - II ☐ Priorité
 - III ☒ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
 - IV ☐ Absence d'unité de l'invention
 - V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
 - VI ☐ Certains documents cités
 - VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
 - VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 11/04/2001	Date d'achèvement du présent rapport 06.12.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Paloniemi Legland, R N° de téléphone +49 89 2399 7315 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/02523

I. Bas du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-23 version initiale

Revendications, N°:

1-19 version initiale

Dessins, feuilles:

1/3-3/3 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02523

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

1. La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- ☐ l'ensemble de la demande internationale.
- ☒ les revendications n°s 16-19 concernant la possibilité d'application industrielle.

parce que :

- ☒ la demande internationale, ou les revendications n°s 16-19 en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue d'effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :
voir feuille séparée
- ☐ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n°s en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :
- ☐ les revendications, ou les revendications n°s en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.
- ☐ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n°s en question.

2. Le listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés n'est pas conforme à la norme prévue dans l'annexe C des instructions administratives, de sorte qu'il n'est pas possible d'effectuer un examen préliminaire international significatif :

- ☐ le listage présenté par écrit n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.
- ☐ le listage sous forme déchiffrable par ordinateur n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02523

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 11-14
	Non : Revendications 1-10, 15-19
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-19
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-15
	Non : Revendications

**2. Citations et explications
voir feuille séparée**

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Concernant le point III**Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle**

La présente Administration considère que l'objet des revendications 16-19 est visé par les dispositions de la règle 67.1 (iv) PCT. C'est pourquoi il ne sera pas émis d'opinion quant à la question de savoir si l'objet de ces revendications est susceptible d'application industrielle (article 34(4) a) i) PCT).

Concernant le point V**Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

Il n'existe pas de critère unifié dans les Etats parties au PCT pour déterminer si les revendications 16-19 sont susceptibles d'application industrielle. La brevetabilité peut aussi dépendre de la manière dont les revendications ont été formulées. Ainsi, l'Office européen des brevets ne considère pas comme susceptible d'application industrielle l'objet de revendications d'utilisation d'un composé à des fins médicales. Par contre, peuvent être acceptées des revendications relatives à un composé connu, pour une première utilisation à des fins médicales ainsi que des revendications relatives à l'utilisation d'un tel composé dans la fabrication d'un médicament en vue d'un nouveau traitement médical.

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: BROWNLIE, ROBERT M., ET AL.: 'Stimulation of secretory antibodies against Bordetella pertussis antigens in the lungs of mice after oral or intranasal administration of liposome incorporated cell-surface antigens' MICROBIAL PATHOGENESIS, vol. 14, no. 2, février 1993 (1993-02), pages 149-60, XP000920597 Aberdeen (GB)
- D2: FR-A-2 769 022 (CAPSULIS) 2 avril 1999 (1999-04-02) cité dans la demande

THIS PAGE BLANK (USPTO)

La revendication 1 définit une utilisation de vésicules multilamellaires à structure en oignon présentant une structure interne cristal-liquide formée d'un empilement bicouches concentriques à base d'agents amphiphiles alternant avec des couches d'eau, de solution aqueuse ou de solution d'un liquide polaire et au sein desquelles se trouve incorporé au moins un antigène, pour la fabrication d'une composition destinée à une administration **par voie muqueuse**.

Le document D1 décrit des vésicules multilamellaires (abstract) au sein desquelles se trouve incorporé un antigène (p.153 dernier paragraphe et p.155) destiné à une administration **par voie nasale et orale**. Par conséquent, l'objet de la revendication 1 n'est pas nouveau (Art. 33(2) PCT). Il en est même pour les revendications 2-10 et 15-19.

Le problème technique était de développer de nouveaux adjuvants et vecteurs capables d'induire une réponse muqueuse et systémique efficace en terme de protection contre l'agent pathogène.

Le document D2 décrit des vésicules qui ont la même structure que celles utilisés selon la présente demande et leur utilisation pour la vaccination en voie parentérale. Il est évident pour l'homme du métier, en se basant sur l'information des documents D1 et D2, d'utiliser les vésicules à structure en oignon incorporant en leur sein un antigène pour l'administration par voie muqueuse (la combinaison des documents D1 et D2). En conséquence, l'objet des revendications 1-19 n'implique pas une activité inventive selon article 33(3) PCT.

Concernant le point VII

Irrégularités dans la demande internationale

Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans le document D1 et ne cite pas ce document.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
22 mars 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/19335 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷: A61K 9/00

App. 16, 14, Rue des As, F-33600 Pessac (FR). LAVER-
SANNÉ, René [FR/FR]; 62, Avenue du Parc d'Espagne,
F-33600 PESSAC (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/02523

(22) Date de dépôt international:

13 septembre 2000 (13.09.2000)

(74) Mandataires: GIRAUD, Françoise etc.; Cabinet Beau de
Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris Cedex 07
(FR).

(25) Langue de dépôt:

français

(81) États désignés (national): AU, CA, JP, MX, US.

(26) Langue de publication:

français

(84) États désignés (régional): brevet européen (AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE).

(30) Données relatives à la priorité:

99/11465

14 septembre 1999 (14.09.1999) FR

Publiée:

— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport.

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): CAP-
SULIS [FR/FR]; 218-228 Avenue du Haut-Lévêque,
F-33600 Pessac (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): GAUBERT,
Sophie [FR/FR]; Résidence Les Cottages de la Réserve,

(54) Title: COMPOSITION TO BE ADMINISTERED THROUGH MUCOUS MEMBRANE

(54) Titre: COMPOSITIONS DESTINEES A UNE ADMINISTRATION PAR VOIE MUQUEUSE

(57) Abstract: The invention concerns a novel use of onion-structured multilamellar vesicles having a liquid-crystal internal structure formed by stacked concentric double layers based on amphiphilic agents with layers of water, aqueous solution or solution of polar liquid and wherein is incorporated at least an antigen for making a composition, in particular a pharmaceutical composition, and more particularly a vaccine composition, to be administered through a mucous membrane to induce a mucous and/or seral systemic response and/or for protecting the system against infection caused by said antigen. The invention also concerns a vaccine method through a mucous membrane and a method for producing antibodies, in particular, IgA. The invention is particularly applicable for intranasal administration.

(57) Abrégé: La présente invention concerne une nouvelle utilisation de vésicules multilamellaires à structure en oignon présentant une structure interne cristal-liquide formée d'un empilement de bicouches concentriques à base d'agents amphiphiles alternant avec des couches d'eau, de solution aqueuse ou de solution d'un liquide polaire et au sein desquelles se trouve incorporé au moins un antigène, pour la fabrication d'une composition notamment pharmaceutique et plus particulièrement vaccinale destinée à une administration par voie muqueuse pour induire une réponse muqueuse et/ou systémique sérique et/ou pour protéger l'organisme à l'égard de l'infection dont est responsable ledit antigène. L'invention concerne également un procédé de vaccination par voie muqueuse et un procédé de production d'anticorps, notamment d'IgA. L'invention s'applique tout particulièrement dans le cas d'une administration par voie nasale.

WO 01/19335 A2

THIS PAGE BLANK (USF10)

Compositions destinées à une administration par voie muqueuse.

La présente invention concerne de nouvelles compositions destinées à une administration par voie muqueuse. Plus particulièrement, elle concerne une composition pharmaceutique, notamment vaccinale destinée à une administration par voie muqueuse.

Elle concerne également un procédé de production d'anticorps, notamment d'IgA.

On donne ci-après quelques définitions :

Administration par voie muqueuse : administration non invasive de l'antigène à un site muqueux, par exemple

- aire naso-pharyngée
- aire buccale
- arbre bronchique
- intestin
- tractus uro-génital
- oreille interne
- conjonctive
- glandes mammaires, salivaires et lacrymales.

Parmi ces différents constituants du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT), certaines voies d'introduction sont d'un accès et d'une acceptabilité plus aisés : nasale, buccale, gastro-intestinale, rectale et vaginale.

Réponse muqueuse : réponse du système immunitaire au niveau des muqueuses caractérisée par une production d'IgA (isotype en concentration importante dans les muqueuses) et d'IgG et/ou une réponse cellulaire au sein du site muqueux et des ganglions drainants.

Réponse systémique : réponse du système immunitaire généralisée se traduisant par la présence d'anticorps circulants (IgG et aussi IgA) et/ou une réponse cellulaire (Thelper ou CTL) dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions).

Dissémination de la réponse : installation d'une réponse muqueuse dans d'autres compartiments que celui de l'induction, du fait de la circulation et de la relocalisation des lymphocytes induits au site d'administration (IgA vaginales après administration nasale par exemple).

Adjuvant : substance ajoutée à l'antigène de manière à amplifier et orienter la réponse immunitaire spécifique de cet antigène.

Vecteur synthétique/vectorisation : incorporation de l'antigène dans ou à la surface d'une particule ou vésicule, de manière à protéger l'antigène et/ou à faciliter sa capture par les cellules compétentes du système immunitaire et/ou à faciliter l'apprêtement de l'antigène par lesdites cellules, et ainsi à amplifier la réponse immunitaire. L'addition d'un vecteur vide à l'antigène libre n'apporte pas ou peu d'amplification.

Jusqu'à récemment, les vaccins étaient obtenus à partir de micro-organismes tués, atténués ou moins virulents. L'industrie pharmaceutique aujourd'hui cherche à éviter cette approche à la fois pour des raisons de limitation des effets secondaires, de facilité de production, de sécurité d'administration et d'efficacité.

Les progrès de la biologie moléculaire ont permis la production industrielle de sous-unités de ces micro-organismes en particulier des protéines dites recombinantes, qu'elles soient membranaires, nucléaires ou cytoplasmiques. Malheureusement ces sous-unités ne sont pas assez immunogènes par elles-mêmes pour apporter une réponse suffisante dans l'optique de la vaccination.

Elles ont besoin d'être adjuvantées ou vectorisées pour induire une réponse suffisante.

Aujourd'hui, les seuls adjuvants acceptés en médecine humaine sont l'hydroxyde ou le phosphate d'aluminium ainsi que le phosphate de calcium. Ces sels se présentent sous la forme d'une suspension de grains de sel d'aluminium ou de calcium, à la surface desquels est adsorbé l'antigène. Ils présentent plusieurs inconvénients : ils induisent des réactions locales inflammatoires et la production d'IgE, ils ne sont pas efficaces pour tous les antigènes et ils sont incapables d'engendrer des réactions à médiation cellulaire de type CTL. De fait, ils ne sont pas utilisés jusqu'à présent dans le cas d'administration par voie muqueuse.

Or, l'importance des surfaces muqueuses est considérable, d'une part parce qu'elles sont présentes au niveau de tous les tractus et d'autre part parce qu'elles sont la première ligne de défense contre l'invasion des agents pathogènes.

La protection des surfaces muqueuses est assurée à la fois par des mécanismes de défense innés ou non adaptatifs (péristaltisme, mouvements ciliés et mucus) et par la mise en place d'une réponse immune cellulaire et humorale adaptative spécifique de l'agent pathogène qui peut se généraliser aux autres organes lymphoïdes. C'est le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) qui est responsable de la composante spécifique.

A cet égard, la vaccination par voie muqueuse représente un enjeu considérable.

Aujourd'hui, tous les vaccins sauf celui contre la poliomyélite sont injectables, ce qui implique :

- 5 - Une médicalisation
- Un mauvais accueil
- Un inconfort (fièvre, douleur au site d'injection...)
- Des risques de contamination (HIV, hépatites)
- Un coût élevé dans les pays en voie de développement

10 L'administration par voie muqueuse présenterait un avantage pour différentes raisons :

- des coûts de production moins élevés liés à des conditions de préparation moins contraignantes que celles pour un vaccin injectable
 - son caractère non invasif qui élimine les problèmes liés à l'injection
- 15 décrits ci-dessus

 Pour cela, elle devrait :

- 20 - procurer une immunité aux sites d'administration muqueux, permettant de renforcer par une réponse spécifique la barrière muqueuse, d'où un intérêt pour les infections transmissibles par voie muqueuse (aériennes, génitales....)
- procurer une immunité systémique et une réponse effectrice généralisée suite à une administration aisée
- ne pas entraîner d'effets secondaires (irritation locale).

25 Pour une revue assez complète sur l'immunologie des muqueuses on pourra se reporter au "Handbook of mucosal immunology", édité par Pearay Ogra *et al*, 1994, Academic press, Inc. san Diego Californie, USA.

 De nombreux essais et études ont été réalisés afin de développer de nouveaux adjuvants et vecteurs capables d'induire une réponse muqueuse et systémique efficace en terme de protection contre l'agent pathogène. Différents

30 travaux portent sur l'utilisation de vecteurs vivants recombinants (bactéries ou virus atténués), de vecteurs synthétiques (complexes immunostimulants encore appelés iscoms, ce qui correspond à une abréviation de l'expression anglaise "immunostimulating complexes", liposomes, microsphères...) ou de toxines de micro-organismes (toxine cholérique -CT- ou toxine thermolabile d'*E. Coli* -LT-).

35 Cependant, une grande partie de ces études est encore au stade de la mise au point et la majorité des formulations présentent des inconvénients :

- haute toxicité (CT et LT) et donc impossibilité d'utilisation chez l'homme,

- difficultés de préparation (microsphères),

- faible stabilité (liposomes),

5 - faible efficacité (liposomes).

Plusieurs brevets concernent l'administration par voie muqueuse d'antigènes, vectorisés ou adjuvantés par différents systèmes. On peut citer :

- EP 0 440 289 (Duphar) qui décrit l'utilisation de liposomes en mélange avec un antigène pour la vaccination contre la grippe. Il s'agit là d'un effet adjuvant des lipides, le même résultat étant obtenu lorsque l'antigène est mélangé extemporanément avec les liposomes vides.

- WO 98/10748 (The School of Pharmacy) utilisant des liposomes cationiques, dans le cas d'une injection ou d'une administration par voie muqueuse,

15 - US 5,679,355 (Proteus) décrivant des vésicules non ioniques, qui peuvent être administrées par voie parentérale ou muqueuse (surtout orale).

D'autre part, une très abondante littérature scientifique décrit l'utilisation de microparticules polymères comme vecteur d'antigène par voie muqueuse. Une bonne revue de cette littérature peut être trouvée dans : D. T. O'HAGAN, Adv. Drug Deliv. Rev., 34 (1998) 305-320.

Cependant, aucune de ces technologies n'a abouti aujourd'hui à un produit sur le marché. Les méthodes de présentation de l'antigène doivent donc encore être améliorées et le développement de nouveaux adjuvants ou vecteurs d'antigènes demeure un besoin urgent dans l'industrie du vaccin.

25 Parmi les vésicules, objets sphériques formés d'arrangement moléculaires de molécules amphiphiles, les vésicules multilamellaires à structure en oignon ont fait l'objet d'importantes recherches et ont donné lieu à plusieurs brevets (WO 93/19735 ; WO 95/18601 ; WO 97/00623 ; WO 98/02144 ; WO 99/16468). Elles se distinguent des liposomes par :

30 - leur mode de préparation qui part d'une phase lamellaire à l'équilibre thermodynamique

- leur structure interne cristal-liquide formée d'un empilement régulier de bicouches concentriques d'amphiphiles alternant avec des couches d'eau ou de solution aqueuse ou de solution d'un liquide polaire (glycérol, par exemple)

35 - la nature variée des molécules amphiphiles qui peuvent être utilisées pour les constituer, seules ou en mélange.

La demande internationale WO 99/16468 décrit des vésicules à structure en oignon incorporant en leur sein un antigène et permettant d'amplifier la réponse immunitaire de cet antigène. Cette demande internationale qui décrit pour la première fois l'incorporation (également désignée dans ce document par encapsulation) d'antigènes au sein d'une vésicule multilamellaire à structure en oignon montre clairement dans ses exemples qu'une telle encapsulation permet très nettement d'amplifier la réponse immunitaire lors d'une administration parentérale d'un antigène encapsulé dans une vésicule multilamellaire à structure en oignon.

Les inventeurs de la présente invention ont maintenant découvert que l'administration par voie muqueuse, en particulier nasale, des compositions du type de celles décrites dans la demande WO 99/16468, engendre une réponse immunitaire non seulement au sein de différents sites muqueux mais également dans le compartiment systémique. Cette réponse est caractérisée par l'induction d'immunoglobuline A (IgA). Un tel résultat n'était nullement évident au vu de la demande WO 99/16468 puisque dans les conditions où était faite l'injection dans les exemples de cette demande, l'antigène, même sous forme encapsulée, n'induisait pas de réponse IgA détectable.

Les immunoglobulines (Ig) ou anticorps (Ac), associés à des composants cellulaires, sont des acteurs essentiels dans la réponse immunitaire dirigée contre un pathogène. Les Ig sont des protéines hautement spécifiques de l'antigène.

Différentes classes d'anticorps ont été répertoriées, qui se distinguent par leur mode d'induction, leur localisation et leur fonction (reconnaissance, neutralisation d'activité toxique ou enzymatique).

Dans le compartiment sanguin, la majorité des Ig produites sont des IgG circulantes (sub-divisées en différentes sous-classes), les IgA et les IgE restant très minoritaires. A l'inverse, l'isotype majeur dans les muqueuses est l'IgA qui est produite par les plasmocytes à IgA du système lymphoïde muqueux et sécrétée activement par l'épithélium de la muqueuse.

Les IgA sont des anticorps spécialisés et adaptés à la défense des surfaces muqueuses constamment exposées aux pathogènes. Adaptés, car, du fait de leur structure biochimique (glycosylation, polymérisation, pièce sécrétoire), ils résistent aux effets des protéases sécrétées par les micro-organismes et car, contrairement aux autres isotypes, ils limitent les réactions inflammatoires dans ces compartiments en état d'activation constant. Spécialisés, car ils agissent à

plusieurs niveaux : sécrétés, ils agglutinent les pathogènes, limitent par neutralisation les effets des toxines et l'entrée des pathogènes ; ils peuvent également agir au sein de l'épithélium au cours de leur transcytose ou dans la lamina propria. Ils représentent donc une barrière active essentielle qui, associée à
5 des mécanismes non spécifiques, limitent l'invasion par les pathogènes. Naturellement, à la réponse anticorps, s'associent des réponses cellulaires cytotoxiques et spécifiques qui visent à éliminer le pathogène. Si la réponse locale ne suffit pas, une réponse systémique est enclenchée.

Une des caractéristiques très intéressantes du système immunitaire
10 muqueux est la recirculation des lymphocytes B et T induits à un site muqueux et leur possible domiciliation dans d'autres sites que ceux de l'induction, propageant ainsi la réponse spécifique aux autres tractus. Ce phénomène est très intéressant en terme de vaccination.

Alors que les mécanismes d'induction d'une réponse immune
15 muqueuse sont en cours d'élucidation, il reste souvent extrêmement difficile d'induire une réponse muqueuse par l'administration parentérale d'un antigène (adjuvanté ou non) et même par administration muqueuse de l'antigène. En effet, l'administration par voie parentérale d'un antigène conduit à l'induction d'anticorps spécifiques circulants, de type IgG. Ce type d'injection ne permet pas d'induire des
20 IgA au sein des compartiments muqueux (ni systémique). Il est très clair que la vaccination parentérale ne renforcera pas les défenses naturelles locales nécessaires pour lutter contre beaucoup d'infections respiratoires ou génitales par exemple.

Pour ces différentes raisons, il est tout à fait surprenant, même au vu
25 de l'enseignement de WO 99/16468 que le même antigène incorporé dans les mêmes vésicules, administrées par voie muqueuse (nasale) induise non seulement une réponse systémique (IgG dans les sérums) confirmant par une autre voie les précédents résultats, mais également une réponse dans les sites muqueux. L'incorporation de l'antigène dans les vésicules à structure en oignon engendre la
30 production d'IgA dans le compartiment lié au site d'administration (broncho-pulmonaire) mais aussi dans les autres compartiments muqueux avec une prédominance dans les sécrétions génitales. De plus, il faut noter que l'albumine de sérum humain (HSA), utilisée à titre d'exemple, est un antigène très faiblement immunogène, qui, administré par voie nasale, seul, sans être incorporé dans des
35 vésicules est incapable d'induire une quelconque réponse qu'elle soit muqueuse ou systémique.

De plus, on peut remarquer que l'administration par voie muqueuse nécessite par rapport à l'administration parentérale la prise en charge de l'antigène dans la muqueuse et donc la pénétration de l'antigène, ce qui implique que l'antigène doit être présenté de manière optimale afin de dépasser les mécanismes de défense non spécifiques (mouvements ciliés, mucus) et de résister aux enzymes présents dans la muqueuse ou à sa surface. Il apparaît que ces paramètres sont optimisés par la structure des vésicules lors de l'administration muqueuse. Ces fonctions des vésicules dans l'administration muqueuse n'étaient pas nécessairement présentes lors de l'administration parentérale, où l'injection permet d'atteindre directement des zones plus favorables à une capture par les cellules du système immunitaire.

Le résultat observé par administration muqueuse n'est donc pas une simple extrapolation du résultat obtenu par administration parentérale, mais la mise en évidence d'une nouvelle fonctionnalité des vésicules à structure en oignon.

Les inventeurs de la présente invention ont maintenant découvert que des vésicules identiques à celles décrites dans la demande internationale WO 99/16468 incorporant un antigène provoquaient une réponse immunitaire beaucoup plus forte que l'administration de l'antigène libre. De plus, pour certains antigènes qui n'induisent aucune réponse par administration muqueuse, leur administration, incorporés au sein de vésicules multilamellaires à structure en oignon, permet d'induire une réponse tout à fait remarquable. Enfin la réponse induite se retrouve non seulement au niveau local dans le compartiment muqueux (réponse muqueuse) mais aussi dans la circulation sanguine (réponse systémique sérique).

D'autre part, ces vésicules multilamellaires sont préparées à partir de constituants biocompatibles connus pour leur innocuité. De plus, le procédé de préparation est de mise en œuvre simple et ne fait appel qu'à des appareils courants de la chimie. Le fait que le procédé fasse appel à une phase lamellaire initiale à l'équilibre thermodynamique lui donne une excellente reproductibilité et permet une grande stabilité des vésicules obtenues.

Ainsi, selon l'une de ses caractéristiques essentielles, l'invention concerne une utilisation de vésicules multilamellaires à structure en oignon présentant une structure interne cristal-liquide formée d'un empilement de bicouches concentriques à base d'agents amphiphiles alternant avec des couches d'eau, de solution aqueuse ou de solution d'un liquide polaire et au sein desquelles

se trouve incorporé au moins un antigène, pour la fabrication d'une composition, plus particulièrement pharmaceutique, et notamment vaccinale, destinée à une administration par voie muqueuse.

5 Par le terme "incorporé" dont l'utilisation nous semble préférable à celle du terme "encapsulé", on entend que le ou les antigènes font partie intégrante de l'entité constituée par la vésicule. En effet, on peut trouver des molécules d'antigène(s) dans n'importe quelle couche comprise entre le centre et la périphérie de ladite vésicule.

10 Comme cela ressort de la description détaillée qui suit ainsi que des exemples, les compositions pharmaceutiques utilisées selon l'invention permettent la préparation d'un vaccin muqueux destiné à induire une réponse muqueuse et ou systémique sérique.

15 Ainsi que cela ressort clairement des exemples, les vésicules à structure en oignon telles que définies précédemment incorporant un antigène induisent, lorsqu'elles sont administrées par voie muqueuse, chez l'homme ou l'animal, la production d'anticorps.

20 Comme il a été indiqué, un des avantages de l'invention est d'induire une production d'anticorps très importante caractérisée par la présence d'IgA et d'IgG. Cela implique une augmentation de la fréquence des lymphocytes portant des IgA ou des IgG spécifiques de l'antigène. La préparation peut donc être utilisée à des fins d'activation et de différenciation de lymphocytes B spécifiques de l'antigène qui peuvent alors être utilisés en fusion cellulaire afin de produire des anticorps monoclonaux. En effet, les lymphocytes spécifiques, présents en grande quantité dans les ganglions drainant le site d'administration peuvent être
25 immortalisés par fusion avec un myélome non sécréteur et conduire à des hybridomes sécréteurs d'anticorps monoclonaux.

L'invention, de par sa capacité à amplifier et augmenter les réponses anticorps, peut être utilisée également à des fins de production d'anticorps en particulier d'IgA polyclonales, isotype difficile à générer dans les modes
30 opératoires classiques, ou d'IgG polyclonales. Ces anticorps peuvent être utilisés pour des buts non thérapeutiques, par exemple pour la recherche, plus particulièrement pour la recherche en biologie ou en immunologie.

Les méthodes de prélèvement et de purification des anticorps sont connues de l'homme de l'art.

35 Ainsi donc, l'invention concerne également un procédé de production d'anticorps, et plus particulièrement d'IgA.

Par ailleurs, il a été mis en évidence que la composition de l'invention, lorsqu'elle est administrée par voie muqueuse, induit une protection de l'organisme à l'égard de l'infection dont est responsable l'antigène incorporé dans ladite composition.

5 Ainsi, selon une autre de ses caractéristiques essentielles, l'invention concerne un procédé de traitement du corps humain ou animal par vaccination par voie muqueuse selon lequel on administre une composition contenant des vésicules multilamellaires à structure en oignon présentant une structure interne cristal-liquide formée d'un empilement de bicouches concentriques à base d'agents
10 amphiphiles alternant avec des couches d'eau, de solution aqueuse ou de solution d'un liquide polaire et au sein desquelles se trouve incorporé au moins un antigène.

 Comme cela ressort de la description et des exemples qui suivent, il s'est avéré que les compositions de l'invention dans lesquelles l'antigène se trouve
15 incorporé dans une vésicule à structure en oignon, telle que définie ci-dessus, permettent, lorsqu'elles sont administrées par voie muqueuse, d'engendrer une réponse immune muqueuse et de stimuler le tissu lymphoïde muqueux commun. De telles capacités se révèlent d'une importance particulière lorsque l'on s'adresse à des antigènes à potentiel vaccinant, face à des pathogènes invasifs à tropisme
20 muqueux.

 La double possibilité d'induire à la fois une réponse muqueuse et une réponse systémique présente un grand intérêt en vaccination car elle simplifie l'administration tout en offrant une immunité à plusieurs niveaux : muqueux pour défendre les voies d'accès aux micro-organismes et systémiques pour les
25 infections plus disséminées ou généralisées.

 Par ailleurs, les résultats obtenus dans le cadre de l'invention, démontrent que l'invention permet non seulement d'amplifier la réponse anticorps, mais qu'elle génère de plus une réponse immunitaire à efficacité protectrice contre l'infection. L'invention est donc applicable aussi bien à la
30 production d'anticorps, qu'à la vaccination.

 Les résultats obtenus permettent d'affirmer que les vésicules administrées par voie muqueuse, en particulier par voie nasale, peuvent être utilisées afin d'induire ou d'amplifier la réponse anticorps dans les compartiments muqueux, de disséminer cette réponse à d'autres sites plus éloignés du site
35 d'administration et de générer une réponse systémique.

Les vésicules utilisées selon l'invention, ont généralement des diamètres compris entre 0,1 et 25 μm , de préférence entre 0,2 et 15 μm .

Plus précisément, les vésicules utilisées selon l'invention sont de préférence constituées de plusieurs couches d'agents amphiphiles alternant avec
5 des couches de phase aqueuse ou polaire. L'épaisseur de chacune de ces couches est une épaisseur moléculaire, typiquement de l'ordre de 5 à 10 nanomètres. Pour un empilement d'une dizaine à quelques centaines de couches, on obtient donc un diamètre compris entre 0,1 μm et quelques dizaines de micromètres. C'est ce qui est observé expérimentalement, les vésicules étant observables en microscopie
10 optique (en lumière polarisée afin d'avoir un meilleur contraste lié à leur biréfringence), soit comme des points non résolus pour les plus petites d'entre elles, soit comme des sphères biréfringentes pour les plus grosses. Le profil de tailles peut être étudié à l'aide d'un granulomètre laser (utilisant la diffusion statique d'un faisceau laser, analysée sous plusieurs angles). On obtient en général
15 un profil gaussien centré sur une valeur variant entre 0,1 et 25 μm montrant une faible hétérogénéité de la taille pour une formulation donnée, dans des conditions opératoires de préparation données.

Les vésicules dans lesquelles se trouve incorporé l'antigène ont, comme exposé précédemment, une structure multilamellaire en oignon et sont
20 constituées, de leur centre jusqu'à leur périphérie, d'une succession de couches lamellaires séparées par un milieu liquide. Ces vésicules peuvent être obtenues par un procédé comprenant la préparation d'une phase lamellaire cristal-liquide et sa transformation par application d'un cisaillement. Un tel procédé est en particulier décrit dans le brevet WO 93/19735 issu du brevet français FR-2 689 418 ou
25 WO 95/18601 introduits ici par référence.

Selon le brevet français FR-2 689 418, cette transformation peut être faite lors d'une étape de cisaillement homogène de la phase cristal-liquide. ce qui conduit à des vésicules encore appelées microcapsules de taille contrôlée. Toutefois, en jouant sur la formulation de la phase lamellaire cristal-liquide, en
30 particulier sur la nature des tensioactifs entrant dans sa composition, la transformation de cette phase cristal-liquide en vésicules peut être obtenue par simple sollicitation mécanique, en particulier lors du mélange des constituants.

De telles vésicules présentent, entre autres, l'avantage de pouvoir être préparées par un procédé de préparation particulièrement simple permettant
35 d'utiliser une grande variété de tensioactifs.

Un autre avantage, lié lui aussi essentiellement au procédé utilisé pour préparer les vésicules à structure en oignon utilisées selon l'invention, réside dans le fait que l'on incorpore les actifs et les additifs préalablement à la formation des vésicules, ce qui permet un excellent rendement d'encapsulation, d'où une
5 meilleure efficacité et une économie très importante pour des molécules extrêmement coûteuses.

De telles structures sont avantageusement obtenues par incorporation d'au moins un antigène dans une phase lamellaire cristal-liquide comprenant au moins un agent tensioactif puis transformation de cette phase cristal-liquide
10 lamellaire en une phase dense de vésicules multilamellaires de petite taille.

Ainsi, les vésicules utilisées selon l'invention peuvent être obtenues selon un procédé selon lequel on prépare une phase cristal-liquide lamellaire incorporant au moins un antigène et on provoque le réarrangement de ladite phase cristal-liquide en vésicules multilamellaires par application d'un cisaillement.

15 Ce cisaillement pourra être un cisaillement homogène, ce qui présente l'avantage de conduire à des vésicules de taille parfaitement homogène. Toutefois, une simple agitation mécanique pourra s'avérer suffisante pour conduire à la formation des vésicules multilamellaires de l'invention.

L'antigène pourra être toute molécule pour laquelle on souhaite
20 engendrer une réponse immunitaire, qu'il ait une origine exogène tel qu'un organisme pathogène infectieux, parasites ou micro-organismes (levures, champignons, bactéries ou virus) ou une origine naturelle intrinsèque (cas des maladies auto-immunes ou de la cancérisation). Il peut être de différentes natures biochimiques.

25 Il peut, en particulier, s'agir d'un antigène choisi dans le groupe constitué :

- des protéines, en particulier des protéines extraites ou recombinantes, glycosylées ou non,
- des peptides,
- 30 - des lipopeptides,
- des polysaccharides,

ou représentant un mélange de plusieurs de ces composants.

Les vésicules multilamellaires à structure en oignon sont préparées selon les méthodes décrites précédemment, en particulier dans la demande
35 internationale W0 99/16468. Les molécules amphiphiles utilisées pour leur préparation seront choisies, sans que cela soit une obligation, parmi les molécules

faisant l'objet d'une description dans la pharmacopée, ou déjà utilisées dans des médicaments appliqués aux muqueuses.

- Selon une variante avantageuse, les membranes des vésicules contenues dans les compositions de l'invention contiennent au moins un agent tensioactif choisi dans le groupe constitué :
- 5 - des phospholipides hydrogénés ou non hydrogénés,
- des acides gras en C₆ à C₃₀, saturés ou mono- ou polyinsaturés, linéaires ou ramifiés, sous forme d'acide ou de sel d'un métal alcalin, alcalino-terreux ou d'une amine,
- 10 - des esters, éthoxylés ou non, de ces mêmes acides gras et
. de saccharose,
. de sorbitan,
. de mannitol,
. de glycérol ou de polyglycérol,
- 15 . de glycol,
- des mono-, di- ou triglycérides ou des mélanges de glycérides de ces mêmes acides gras,
- des alcools gras en C₆ à C₃₀, saturés ou mono- ou polyinsaturés, linéaires ou ramifiés, éthoxylés ou non,
- 20 - des éthers, éthoxylés ou non, de ces mêmes alcools gras et
. de saccharose,
. de sorbitan,
. de mannitol,
. de glycérol ou de polyglycérol,
- 25 . de glycol,
- des huiles végétales polyéthoxylées, hydrogénées ou non hydrogénées,
- des polymères séquencés de polyoxyéthylène et de polyoxypropylène (poloxamères),
- de l'hydroxystéarate de polyéthylèneglycol,
- 30 - des alcools à squelette stérol tel que le cholestérol, le sistostérol,
- des sphyngolipides,
- des polyalkylglucosides,
- des copolymères de polyéthylèneglycol et d'alkylglycol (par exemple la famille des ELFACOS de AKZO NOBEL),
- 35 - des copolymères di- ou tribloc d'éthers de polyéthylèneglycol et de polyalkylèneglycol (par exemple la famille des ARLACELL de ICI).

A ces tensioactifs qui peuvent être utilisés seuls ou en mélange, on peut éventuellement ajouter des co-tensioactifs afin d'améliorer la rigidité et l'étanchéité des membranes formant la vésicule. Parmi ces molécules, on peut citer :

- 5 - le cholestérol et ses dérivés, en particulier les esters de cholestérol chargés ou neutres comme le sulfate de cholestérol
- les autres dérivés à squelette stérol, en particulier ceux d'origine végétale (sitostérol, stigmasterol...)
- les céramides.

10 La formulation fait avantageusement intervenir un mélange de molécules tensioactives. Il est généralement utilisé au moins deux tensioactifs différents ayant des balances hydrophile-lipophile différentes, ce qui permet de régler en continu les propriétés des bicouches et ainsi de contrôler l'apparition de l'instabilité qui gouverne la formation des vésicules multilamellaires.

15 Ainsi, on choisira avantageusement parmi les tensioactifs ci-dessus, deux tensioactifs présentant des propriétés relativement différentes, en particulier une balance hydrophile-lipophile (HLB) différente. Le premier tensioactif présentera avantageusement une balance hydrophile-lipophile comprise entre 1 et 6, de préférence entre 1 et 4, alors que le deuxième tensioactif aura une balance

20 hydrophile-lipophile comprise entre 3 et 15, de préférence comprise entre 5 et 15.

La préparation obtenue après transformation de la phase lamellaire cristal-liquide en vésicules multilamellaires peut ensuite être diluée, en particulier avec un solvant aqueux tel que, par exemple, une solution tampon, une solution saline ou une solution physiologique, pour obtenir ainsi une suspension aqueuse

25 de vésicules.

La technique d'encapsulation utilisée selon la présente invention permet d'atteindre aisément des rendements d'encapsulation très élevés, voire voisins de 100 %. Toutefois, de tels rendements ne sont pas toujours indispensables en fonction des applications visées.

30 Ainsi, le rendement d'encapsulation du (ou des) antigène(s) dans les compositions de l'invention est avantageusement supérieur à 50 %, de préférence supérieur à 80 %.

Il semble que la structure des vésicules soit responsable des résultats particulièrement avantageux obtenus, et que les vésicules multilamellaires de

35 l'invention permettent à l'antigène d'arriver intact jusqu'aux cellules présentatrices de l'antigène (CPA) et de favoriser sa capture par ces cellules. Il semble donc bien

que la fonction des vésicules de l'invention est de vectoriser, de protéger et d'améliorer la capture de l'antigène par le système immunitaire.

Un autre avantage de la technologie est que l'on peut rajouter à cette formulation des polymères naturels ou artificiels tels que les polysaccharides (alginates, chitosan, etc.) afin de renforcer la solidité de la vésicule, et lui permettre de rester plus longtemps sur le site d'administration ou dans l'organisme, délivrant ainsi l'antigène sur un temps plus long. Ces polymères peuvent être aussi bien incorporés dans la vésicule, que déposés autour sous la forme d'un enrobage. Dans ce cas la vésicule ou la particule formée des vésicules enrobées dans la matrice polymère a un diamètre supérieur à celui des vésicules seules. Ces polymères peuvent éventuellement être réticulés pour renforcer encore leur solidité.

De plus, et c'est un des autres avantages de la technologie, la formulation peut être complétée par l'addition de molécules immuno-modulatrices (chitosan, interleukines...) qui renforceront par leurs propriétés intrinsèques l'amplification et l'orientation de la réponse immunitaire.

Les vésicules incorporant les antigènes sont avantageusement préparées dans un procédé consistant à préparer, dans un premier temps, la phase lamellaire. Celle-ci s'obtient par simple mélange des ingrédients, dans un ordre déterminé par l'expérimentateur d'après les miscibilités de chacun des constituants. Il peut être nécessaire de chauffer certains constituants pâteux ou solides afin de faciliter leur incorporation. Dans ce cas on additionne l'antigène de préférence en fin de mélange afin de lui éviter de subir une température trop élevée. On peut aussi préparer un mélange de tous les constituants sauf de l'antigène ou sa solution aqueuse sous forme d'un mélange « stock » qu'on utilisera selon les besoins pour préparer la phase lamellaire. La solution aqueuse peut contenir différents constituants destinés à assurer sa compatibilité biologique et en particulier des mélanges tampons mais également différents antigènes. La phase lamellaire ainsi préparée est ensuite soumise à un cisaillement modéré (de 0 à 1000s⁻¹) pendant un temps limité (de 0 à 60 minutes).

Dans la plupart des cas, ce cisaillement est obtenu directement par l'action du dispositif ayant servi au mélange. Pour les très petites quantités, il peut être obtenu à la main par mélange de la préparation à l'aide d'une microspatule dans un tube de type Eppendorf.

La phase lamellaire cisailée est ensuite dispersée dans un milieu final, en général de l'eau ou un tampon, identique ou différent de celui ayant servi lors

de la préparation de la phase lamellaire. Cette dispersion se fait avantageusement à température ambiante (20-25°C) par addition lente du milieu sur la phase lamellaire sous agitation constante.

Un conservateur et éventuellement d'autres additifs destinés à compléter la formulation galénique peuvent être ajoutés au produit.

Toutes les compositions décrites précédemment comprenant au moins un antigène incorporé au sein des vésicules à structure lamellaire en oignon présentent l'avantage de pouvoir être utilisées pour une administration par voie muqueuse et tout particulièrement par voie nasale et d'induire une réponse muqueuse et/ou systémique sérique.

L'exemple I donné ci-après met clairement en évidence un tel effet avec HSA.

Les figures 1 et 2 données en référence à cet exemple rassemblent les réponses obtenues d'une part dans différents prélèvements muqueux (figure 1) et d'autre part dans les sérums des animaux (figure 2) après une administration par voie nasale de compositions selon l'invention (groupe I) en comparaison avec ceux obtenus par administration soit des compositions dans lesquelles le même antigène est libre (groupe II), soit de compositions contenant les mêmes vésicules mais vides (groupe III).

L'exemple II illustre un procédé d'immunisation avec la FHA. Les résultats obtenus dans cet exemple sont illustrés par les figures 3, 4 et 5 qui montrent respectivement :

- Figure 3 : les réponses anticorps dans différents sites muqueux.
- Figure 4 : les réponses anticorps dans les sérums,
- Figure 5 : la charge bactérienne pulmonaire des souris infectées par *Bordetella pertussis*.

EXEMPLES

EXEMPLE I : PRODUCTION D'ANTICORPS SPECIFIQUES DE HSA

I - Préparation de vésicules contenant l'albumine de sérum humain (HSA)

Formulation (en pourcentage en poids)

Potassium oléate (FLUKA) :	05,0 %
② Alcool laurique éthoxylé à 4 oxydes d'éthylène (SEPPIC) :	02,0 %
③ Cholestérol de lanoline (FLUKA) :	05.0 %

④ Cholestérol 3-sulfate (SIGMA) :	02,5 %
⑤ PBS 1x stérile (LIFE TECHNOLOGIES) :	20,0 %
⑥ Lécithine de soja Phospholipon 90G (NATTERMANN) :	45,5 %
⑦ Albumine humaine (SIGMA) à 30 mg/ml dans du PBS 1x :	20,0 %

5

Mode opératoire

Les composants sont stérilisés par irradiation UV pendant 60 mn. Les contenants et accessoires (spatules, agitateurs...) sont stérilisés à la flamme juste avant utilisation.

10

Les constituants ① à ⑤ sont introduits dans un pilulier, dans un ordre indifférent, puis chauffés à 80°C pendant 60 min sous très forte agitation magnétique. La solubilisation totale des constituants ③ et ④ est vérifiée par observation microscopique.

15

On introduit à température ambiante dans un tube Eppendorf de 1,5 ml stérile la quantité désirée du mélange ① à ⑤ puis on rajoute les constituants ⑥ et ⑦. L'ensemble est homogénéisé à l'aide d'une aiguille stérile, puis laissé au repos une nuit à 4°C.

La préparation est ensuite dispersée à 33,33 % dans du PBS 1x stérile.

20 II - Protocole d'immunisation

Afin de tester l'effet des vésicules selon l'invention lors d'une administration muqueuse, des souris BALB/c femelles de 6-8 semaines ont reçu, par voie nasale, deux fois (à J0 et J30), différentes préparations décrites ci-dessous. L'administration par voie nasale nécessite l'anesthésie des animaux par une solution, mélange de Kétamine, Valium et Atropine, injectée par voie intra-péritonéale. Un mois après la dernière immunisation, les animaux sont sacrifiés, les sérums sont collectés et les prélèvements des sécrétions muqueuses effectués, à l'exception des lavages vaginaux qui sont prélevés sur la souris vivante pendant les trois jours précédents la fin de l'expérimentation.

30

Groupes d'immunisation

Les souris ont été réparties en 4 groupes notés I à IV, le groupe IV constituant un groupe témoin (souris non immunisées également dénommées souris naïves) et les autres groupes étant soumis à un protocole d'immunisation tel que défini précédemment au moyen des produits suivants :

35

- groupe I :

- ♦ HSA encapsulée : 20µl par narine de vésicules selon l'invention incorporant HSA ce qui correspond à 80 µg de HSA par souris

- groupe II :

- 5 ♦ HSA : 20µl par narine d'une solution de HSA correspondant à 80 µg par souris

- groupe III :

- ♦ Vésicules vides : 20µl par narine de vésicules selon l'invention vides

10 Prélèvements des sécrétions

Tous les prélèvements sont effectués avec des solutions froides (4°C) et sont entreposés sur glace au fur et à mesure afin de limiter les dégradations par les enzymes protéolytiques.

15 *Lavages broncho-alvéolaires :*

La trachée des souris est canulée à l'aide d'une sonde et 750µl de PBS sont injectés lentement afin de ne pas créer d'hémorragie, les poumons sont lavés ainsi 3 fois avec la même solution, le prélèvement est ensuite centrifugé afin d'éliminer les cellules pulmonaires et séparé en fractions aliquotes conservées à -20°C jusqu'au dosage.

20

Lavages vaginaux

Ces prélèvements sont réalisés sur la souris vivante non anesthésiée, par injection de 50µl de PBS dans l'orifice du vagin, le vagin est lavé 3 fois avec la même solution. Ce type de prélèvement est renouvelé durant 3 jours consécutifs afin de couvrir les variations dues au cycle hormonal de la souris. Les sécrétions sont groupées et conservées à -20°C.

25

Lavages intestinaux

L'intestin est prélevé, libéré du mésentère et rincé dans l'eau afin d'éliminer le sang extérieur. Il est ensuite découpé longitudinalement et incubé sur glace dans 1 ml d'une solution de lavage enrichie en inhibiteur de protéases. L'ensemble est centrifugé et le surnageant est récupéré et congelé à -20°C.

30

Dosage des anticorps

Les anticorps spécifiques de HSA présents dans les sérums et sécrétions sont dosés par technique ELISA où l'on détermine les IgA et IgG spécifiques de HSA (anti-IgA biotinylé/Streptavidine peroxydase, anti-IgG peroxydase). Les résultats sont exprimés en titre moyen déterminé par rapport à un sérum de référence de souris naïve et correspondant à l'inverse de la dilution égale au seuil de référence.

III - Résultats

Les résultats du dosage des anticorps spécifiques sont présentés sous la forme de 2 figures (figure 1 et figure 2) illustrant respectivement les réponses anticorps obtenues dans les prélèvements muqueux pour la réponse associée aux muqueuses et dans les sérums des animaux (réponse systémique).

Sur ces figures, on a également indiqué dans chaque cas le nombre de souris ayant réagi au protocole d'immunisation par rapport au nombre de souris soumises à ce protocole (la mention "n/m" signifiant que n souris ont réagi sur m souris soumises au protocole d'immunisation).

Il apparaît clairement au vu de ces deux figures que l'administration par voie nasale de vésicules selon l'invention incorporant HSA entraîne une production importante d'anticorps dans les poumons (Figure 1). Seule l'immunisation sous la forme encapsulée engendre une réponse immune pulmonaire d'isotype IgA et IgG (l'existence au niveau pulmonaire de ces deux isotypes est rapportée dans différentes publications). Bien que cette voie d'administration ne soit pas la plus aisée chez l'animal, tous les animaux immunisés par voie nasale avec les vésicules selon l'invention sont répondeurs.

L'analyse des autres prélèvements muqueux révèle la présence d'IgA spécifique de HSA dans le vagin et l'intestin des animaux immunisés par les vésicules selon l'invention incorporant HSA, muqueuses très distantes du site d'administration avec une prédilection pour la muqueuse vaginale. Ces réponses indiquent une généralisation de la réponse induite dans le tissu lymphoïde muqueux pulmonaire ou nasal et la circulation et la redistribution des lymphocytes activés et différenciés près du site d'administration.

A la différence de la muqueuse pulmonaire, la réponse isotype spécifique de HSA prédominante dans l'intestin et le vagin est l'IgA. Bien que le titrage des IgG_{H+L} n'ait pu être réalisé dans les lavages vaginaux, des expériences

similaires réalisées avec un autre antigène indique la prédominance des IgA dans les sécrétions vaginales.

Seule la forme vectorisée de l'antigène conduit à une réponse intense et spécifique. Les quelques animaux présentant une réponse IgA détectable dans les groupes immunisés par HSA libre (titre de 3 contre 650 dans les sécrétions vaginales avec les vésicules selon l'invention contenant HSA) ne sont pas différenciables du groupe vésicules selon l'invention vides.

L'étude des sérums des animaux (Figure 2) indique que les vésicules selon l'invention incorporant HSA administrées par voie nasale sont capables d'engendrer une réponse systémique caractérisée par la présence majoritaire d'IgG mais également par un taux important d'IgA sérique. Seule la forme vectorisée conduit à cette production (IgA HSA seule = 35 ; IgA vésicules selon l'invention HSA = 17 620). Il est remarquable d'obtenir une réponse systémique de l'antigène vectorisé. Rappelons qu'il est extrêmement difficile d'induire une réponse IgA sérique par immunisation systémique avec un antigène seul ou accompagné d'un adjuvant autorisé en usage humain.

En conclusion de ces résultats, non seulement la forme dite encapsulée engendre une réponse immune pulmonaire mais aussi, seule cette forme permet la dissémination de la réponse induite dans le tractus respiratoire vers d'autres muqueuses indiquant que les vésicules selon l'invention sont des puissants vecteurs pour induire une immunité muqueuse, en favorisant la prise en charge et l'induction de la réponse au sein d'un site et en la redistribuant à d'autres sites.

EXEMPLE II : PRODUCTION D'ANTICORPS SPECIFIQUES DE FHA ET PROTECTION CONTRE *BORDETELLA PERTUSSIS*

La protéine FHA est une adhésine filamenteuse de *Bordetella pertussis*, la bactérie de la coqueluche. Contrairement à HSA précédemment utilisée, la FHA est plus immunogène et donc susceptible d'induire par elle-même une réponse anticorps. Cette protéine fait partie des antigènes protecteurs contenus dans les vaccins commerciaux contre la coqueluche. Enfin le modèle murin peut être infecté par *Bordetella pertussis* et il est ainsi possible de réaliser un test d'infection suite à l'immunisation muqueuse et de montrer le caractère protecteur de la réponse induite par l'immunisation.

A - Induction d'anticorps

I - Préparation des vésicules contenant FHA

Formulation

	① Oléate de potassium (FLUKA) :	5,0 %
5	② Ether laurique du PEG-4 (Simulsol P4, SEPPIC) :	2,0 %
	③ Cholestérol de lanoline (FLUKA) :	5,0 %
	④ Cholestérol 3-sulfate (SIGMA) :	2,5 %
	⑤ PBS 1x stérile (LIFE TECHNOLOGIES) :	20,0 %
	⑥ Lécithine de soja (Phospholipon 90G, NATTERMANN) :	45,5 %
10	⑦ FHA de <i>Bordetella pertussis</i> dans PBS (1mg/ml) :	20,0 %

Le protocole opératoire de la préparation est similaire à celui de l'exemple 1. Le produit fini a une concentration en FHA de 3 µg pour 40 µl.

II - Protocole d'immunisation

- 15 Pour l'étude de la réponse anticorps, le protocole d'immunisation par voie muqueuse et de prélèvement est identique à ce qui a été décrit dans l'exemple 1. Deux groupes de 5 animaux ont été constitués, le groupe I recevant l'antigène encapsulé dans les vésicules, et le groupe II recevant l'antigène non encapsulé, en solution dans du PBS. A chaque immunisation, chaque animal reçoit
- 20 3 µg de FHA, répartis en deux instillations, une dans chaque narine.

Prélèvements des sécrétions

Les prélèvements sont réalisés de manière strictement identique à ce qui est décrit dans l'exemple 1.

Dosage des anticorps

- 25 Les anticorps spécifiques de FHA présents dans les sérums et sécrétions sont dosés par technique ELISA selon un protocole identique à celui décrit dans l'exemple 1, avec les réactifs spécifiques à l'antigène FHA.

III - Résultats

- 30 Les résultats sont présentés dans les figures 3 et 4, où les titres moyens en anticorps IgA et IgG dans les sécrétions muqueuses (figure 3) et dans le sérum (figure 4) sont donnés pour les deux groupes I et II.

Les sécrétions muqueuses sont respectivement étudiées comme dans l'exemple I, à partir des lavages broncho-alvéolaires (A), des lavages intestinaux (B) et des lavages vaginaux (C).

5 Dans le groupe I de souris immunisées par l'antigène incorporé dans les vésicules de l'invention (Figure 3) la totalité des animaux répondent à l'antigène alors que lorsque l'antigène libre est administré, seul 1/5 des animaux sont répondeurs et ce de manière très faible.

10 Comme dans le cas de HSA de l'exemple 1, on observe une très forte amplification de la réponse anticorps dans les sites muqueux. L'immunisation par voie nasale avec l'antigène incorporé dans les vésicules de l'invention permet d'induire une réponse muqueuse (IgA) dans les poumons, proche du site d'administration (titre en IgA pour l'antigène incorporé dans les vésicules de l'invention 8 925 par rapport à 4,25 pour l'antigène libre) mais également une
15 réponse muqueuse disséminée aux autres compartiments sécrétoires (intestin et vagin) (Titre en IgA vaginales 13 500 pour l'antigène incorporé dans les vésicules de l'invention par rapport à 2,5 pour l'antigène libre). De plus des IgG ont été détectés à des niveaux significatifs dans les trois compartiments muqueux étudiés.

20 Comme dans le cas de HSA, on observe des titres importants en anticorps IgA et IgG dans la circulation (figure 4) suite à l'administration nasale de l'antigène incorporé dans les vésicules (Titre en IgA pour l'antigène dans les vésicules de l'invention 1 300 par rapport à 39,2 pour l'antigène libre ; Titre en IgG 1 265 000 par rapport à 3 000).

25 Les résultats de cet exemple 2 confirment complètement ceux obtenus sur HSA. Ils permettent d'affirmer que les vésicules administrées par voie nasale peuvent être utilisées afin d'induire ou d'amplifier la réponse anticorps dans les compartiments muqueux, de disséminer cette réponse à d'autres sites plus éloignés du site d'administration et de générer une réponse systémique.

B - Test de protection

30 Afin de vérifier si l'immunisation obtenue est protectrice, il a été procédé à un test de protection, dit "challenge test". Dans cette expérience, des souris préalablement immunisées ont été infectées par voie nasale par un nombre défini de *Bordetella pertussis*, puis les animaux ont été sacrifiés à différents
35 temps, pour observer la progression de l'infection. La mesure est faite par comptage des colonies dans les poumons.

I - Préparation des vésicules contenant FHA

La formulation et la préparation des vésicules sont strictement identiques à celle préalablement utilisées pour la caractérisation de la réponse anticorps.

5 II - Protocole d'immunisation

Le protocole d'immunisation et les doses d'antigènes administrées sont identiques à ceux utilisés pour l'induction d'anticorps.

Trois groupes de souris sont utilisés :

- I. Souris immunisées par l'antigène incorporé dans les vésicules de l'invention
- 10 II. Souris immunisées par l'antigène libre en solution dans du PBS
- III. Souris non immunisées

Chaque groupe est composé de 4 souris, immunisées en même temps, avec le même lot d'antigène, afin de pouvoir réaliser toutes les mesures d'infection dans les mêmes conditions.

15 III - Protocole d'infection

Quatre semaines après la deuxième immunisation, les souris sont anesthésiées et infectées par *Bordetella pertussis* par voie nasale (5.10^7 bactéries/souris administrées dans 20 μ l) et la charge infectieuse initiale est vérifiée dès 3 heures après l'infection.

20 IV - Protocole de mesure de la charge infectieuse

Les souris sont sacrifiées et leurs poumons sont prélevés à différents temps après l'infection et dilacérés dans du PBS jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. Différentes dilutions de la suspension sont étalées sur milieu nutritif spécifique des *Bordetella* et les colonies sont comptées après trois
25 jours de croissance.

V - Résultats

Les résultats sont présentés sur la figure 5 où est indiqué le nombre de colonies de *Bordetella pertussis* dans les poumons des souris, 3 jours (J3, barre pleine) et 5 jours (J5, barre creuse) après l'infection en millions de colonies
30 bactériennes pour les trois groupes de souris ci-dessous :

Groupe I : souris immunisées par l'antigène incorporé dans des vésicules de l'invention.

Groupe II : souris immunisées par l'antigène libre en solution dans du PBS.

5 Groupe III : souris non immunisées.

On observe que, dès le 3^{ème} jour après l'infection, les souris immunisées par l'antigène incorporé dans les vésicules de l'invention ont une charge bactérienne inférieure (facteur 2) à celle des souris immunisées par l'antigène libre, et très inférieure à celle des souris non immunisées (facteur 8).
10 Remarquablement, alors que 5 jours après l'infection, les souris immunisées avec l'antigène libre ainsi que les souris non immunisées voient leur charge bactérienne augmenter, les souris immunisées avec l'antigène incorporé dans les vésicules de l'invention présentent moins de bactéries à J5 qu'à J3 indiquant une évolution favorable de la maladie. De plus, à ce stade, le nombre de colonies bactériennes
15 dans le groupe immunisé avec l'antigène incorporé dans les vésicules de l'invention est 6 fois plus faible que dans le groupe immunisé par FHA libre et 13 fois plus faible que dans le groupe non immunisé indiquant une bonne protection.

Ces résultats démontrent que l'invention permet non seulement d'amplifier la réponse anticorps, mais qu'elle génère de plus une réponse
20 immunitaire à efficacité protectrice contre l'infection. L'invention est donc applicable aussi bien à la production d'anticorps, qu'à la vaccination.

REVENDICATIONS

1. Utilisation de vésicules multilamellaires à structure en oignon
présentant une structure interne cristal-liquide formée d'un empilement de
5 bicouches concentriques à base d'agents amphiphiles alternant avec des couches
d'eau, de solution aqueuse ou de solution d'un liquide polaire et au sein desquelles
se trouve incorporé au moins un antigène, pour la fabrication d'une composition
destinée à une administration par voie muqueuse.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite
10 composition est une composition destinée à induire une réponse muqueuse.
3. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce
que ladite composition est une composition destinée à induire une réponse
systémique sérique.
4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce
15 que ladite composition est une composition destinée à induire la production
d'anticorps.
5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce
que ladite composition est une composition pharmaceutique, notamment
vaccinale, destinée à induire une protection de l'organisme à l'égard de l'infection
20 dont est responsable ledit antigène.
6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce
que ledit antigène a une origine exogène ou naturelle intrinsèque.
7. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 6, caractérisée en ce
que ledit antigène est choisi dans le groupe constitué :
25
 - des protéines, en particulier des protéines extraites ou recombinantes,
glycosylées ou non,
 - des peptides,
 - des lipopeptides,
 - des polysaccharides,
- 30 ou représente un mélange de plusieurs de ces composants.
8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce
que lesdites vésicules contiennent au moins un agent tensioactif choisi dans le
groupe constitué :
 - des phospholipides hydrogénés ou non hydrogénés,

- des acides gras en C₆ à C₃₀, saturés ou mono- ou polyinsaturés, linéaires ou ramifiés, sous forme d'acide ou de sel d'un métal alcalin, alcalino-terreux ou d'une amine,
- des esters, éthoxylés ou non, de ces mêmes acides gras et
 - 5 . de saccharose,
 - . de sorbitan,
 - . de mannitol,
 - . de glycérol ou de polyglycérol,
 - . de glycol,
- 10 - des mono-, di- ou triglycérides ou des mélanges de glycérides de ces mêmes acides gras,
- des alcools gras en C₆ à C₃₀, saturés ou mono- ou polyinsaturés, linéaires ou ramifiés, éthoxylés ou non,
- des éthers, éthoxylés ou non, de ces mêmes alcools gras et
 - 15 . de saccharose,
 - . de sorbitan,
 - . de mannitol,
 - . de glycérol ou de polyglycérol,
 - . de glycol,
- 20 - des huiles végétales polyéthoxylées, hydrogénées ou non hydrogénées,
- des polymères séquencés de polyoxyéthylène et de polyoxypropylène (poloxamères),
- de l'hydroxystéarate de polyéthylèneglycol,
- des alcools à squelette stérol tel que le cholestérol, le sistostérol,
- 25 - des sphingolipides,
- des polyalkylglucosides,
- des copolymères de polyéthylèneglycol et d'alkylglycol,
- des copolymères di- ou tribloc d'éthers de polyéthylèneglycol et de polyalkylèneglycol.
- 30 9. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que lesdites vésicules contiennent en outre au moins un co-tensioactif destiné à améliorer la rigidité et/ou l'étanchéité des membranes desdites vésicules.
- 10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit co-tensioactif est choisi dans le groupe constitué :
 - 35 - du cholestérol et de ses dérivés, en particulier les esters de cholestérol chargés ou neutres comme le sulfate de cholestérol

- des dérivés à squelette stérol, en particulier ceux d'origine végétale tels que le sitostérol ou le sigmastérol,

- des céramides.

5 11. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que lesdites vésicules contiennent en outre une substance immuno-modulatrice.

12. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que lesdites vésicules ont un diamètre compris entre 0,1 et 25 μm , de préférence entre 0,2 et 15 μm .

10 13. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que les bicouches desdites vésicules comprennent au moins deux agents tensioactifs dont l'un présente une balance hydrophile-lipophile (HLB) comprise entre 1 et 6, de préférence comprise entre 1 et 4, et l'autre une balance hydrophile-lipophile (HLB) comprise entre 3 et 15, de préférence comprise entre 5 et 15.

15 14. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que le rendement d'encapsulation de l'antigène (ou des antigènes) au sein desdites vésicules est supérieur à 50 %, de préférence supérieur à 80 %.

15 15. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisée en ce que ladite administration par voie muqueuse est une administration par voie nasale.

20 16. Procédé de traitement du corps humain ou animal par vaccination, caractérisé en ce qu'il comprend l'administration par voie muqueuse d'une composition telle que définie dans l'une des revendications 1 à 15.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que ladite administration est réalisée par voie nasale.

25 18. Procédé de production d'anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend l'introduction dans un organisme hôte, par voie muqueuse, de vésicules lamellaires à structure en oignon présentant une structure interne cristal-liquide formée d'un empilement de bicouches concentriques à base d'agents amphiphiles alternant avec des couches d'eau, de solution aqueuse ou de solution d'un liquide polaire et au
30 sein desquelles se trouve incorporé au moins un antigène et, le prélèvement et la purification de ces anticorps.

19. Procédé de production d'IgA, caractérisé en ce qu'il comprend l'introduction dans un organisme hôte, par voie muqueuse, de vésicules multilamellaires à structure en oignon présentant une structure interne cristal-liquide formée d'un empilement de bicouches concentriques à base d'agents
35 amphiphiles alternant avec des couches d'eau, de solution aqueuse ou de solution

d'un liquide polaire et au sein desquelles se trouve incorporé l'antigène approprié et, le prélèvement et la purification de ces immunoglobulines.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

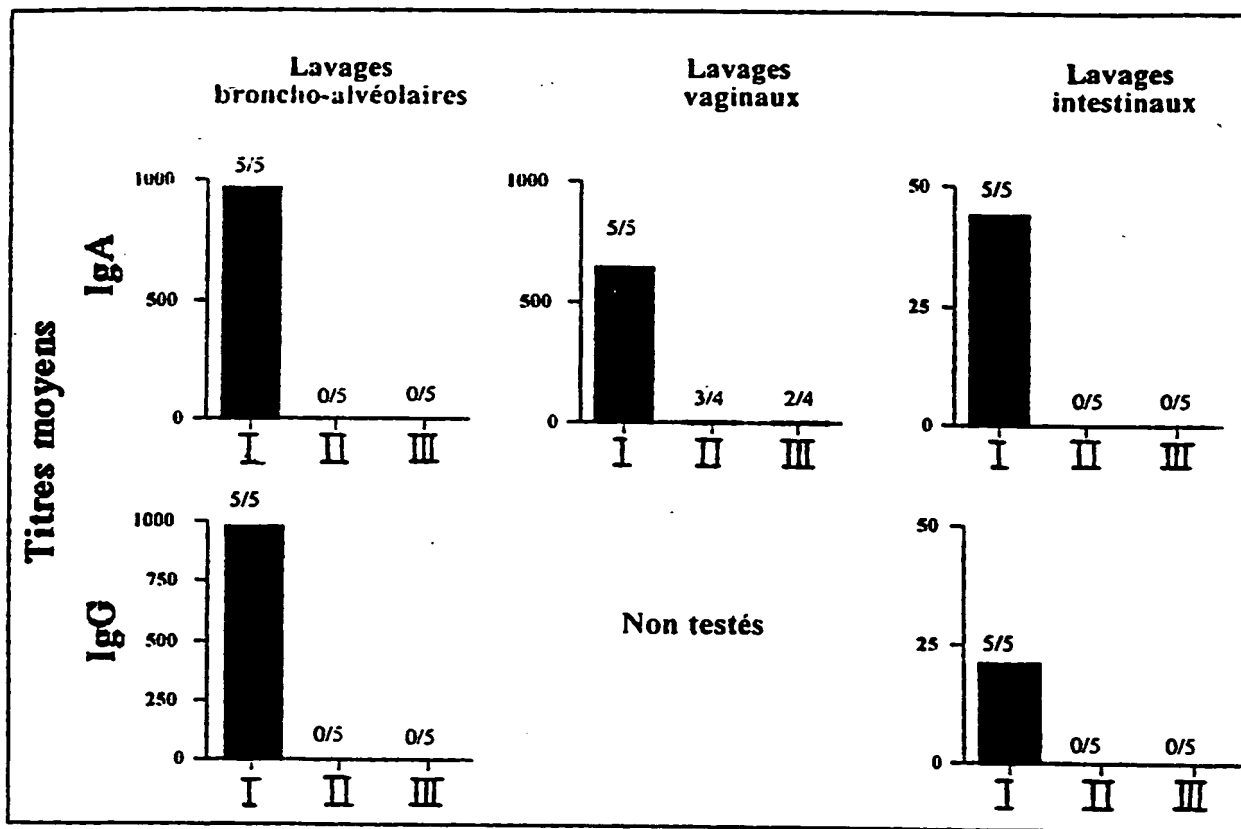


FIG.1

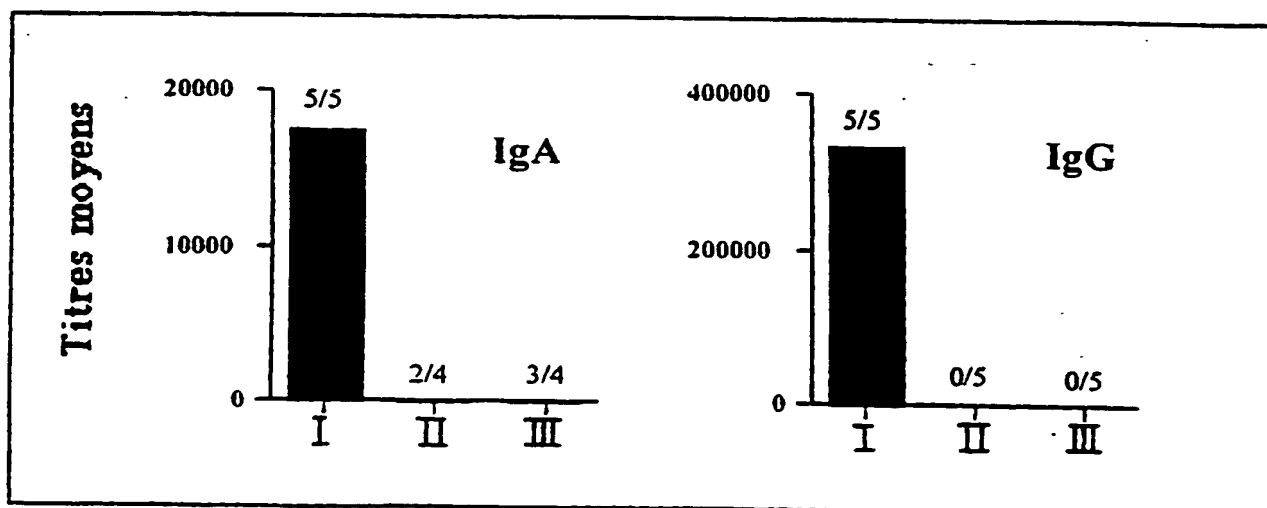


FIG.2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

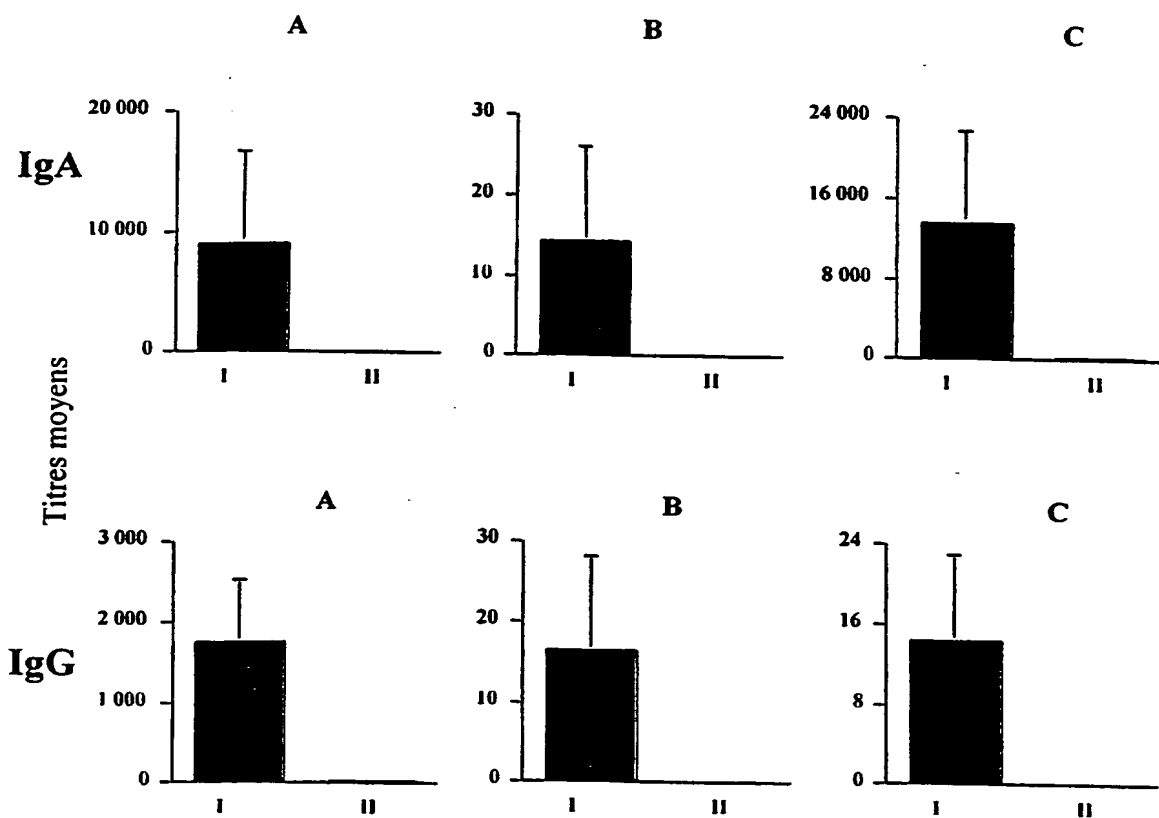


FIG. 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 4

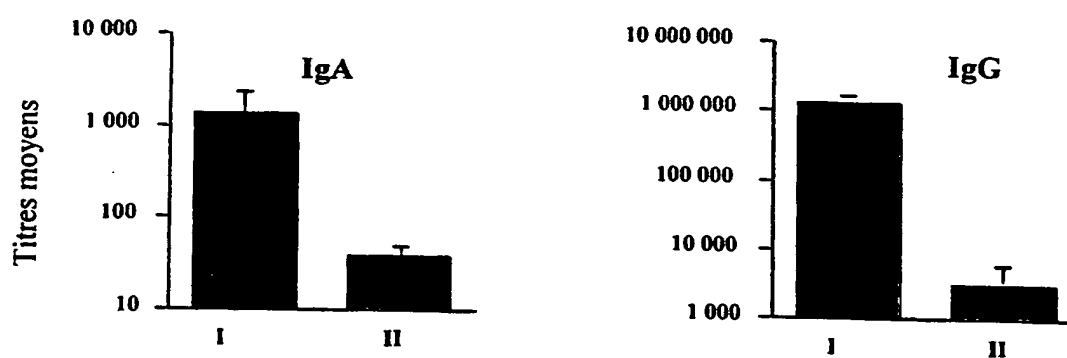
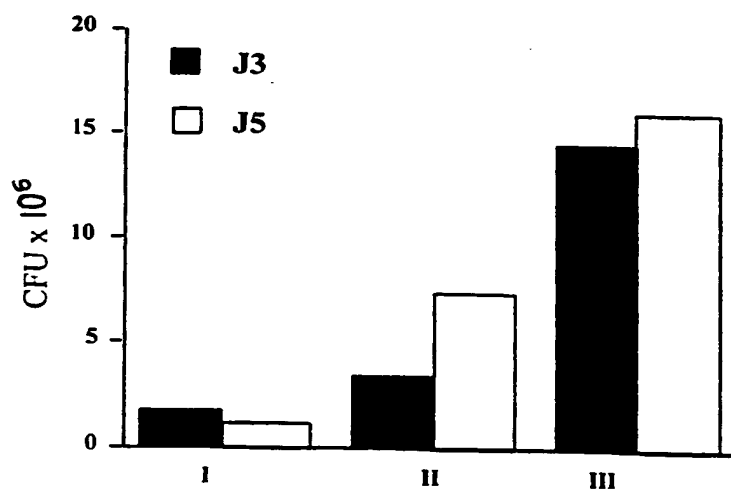


FIG. 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
22 mars 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/19335 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 9/127, 9/00

App. 16, 14, Rue des As, F-33600 Pessac (FR). LAVER-
SANNÉ, René [FR/FR]; 62, Avenue du Parc d'Espagne,
F-33600 PESSAC (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR00/02523

(74) Mandataires : GIRAUD, Françoise etc.; Cabinet Beau
de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris Cedex
07 (FR).

(22) Date de dépôt international :
13 septembre 2000 (13.09.2000)

(81) États désignés (national) : AU, CA, JP, MX, US.

(25) Langue de dépôt : français

(84) États désignés (régional) : brevet européen (AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE).

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
99/11465 14 septembre 1999 (14.09.1999) FR

Publiée :
— avec rapport de recherche internationale

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : CAP-
SULIS [FR/FR]; 218-228 Avenue du Haut-Lévêque,
F-33600 Pessac (FR).

(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 4 octobre 2001

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : GAUBERT,
Sophie [FR/FR]; Résidence Les Cottages de la Réserve,

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: COMPOSITION TO BE ADMINISTERED THROUGH MUCOUS MEMBRANE

(54) Titre : COMPOSITIONS DESTINÉES A UNE ADMINISTRATION PAR VOIE MUQUEUSE

(57) Abstract: The invention concerns a novel use of onion-structured multilamellar vesicles having a liquid-crystal internal structure formed by stacked concentric double layers based on amphiphilic agents with layers of water, aqueous solution or solution of polar liquid and wherein is incorporated at least an antigen for making a composition, in particular a pharmaceutical composition, and more particularly a vaccine composition, to be administered through a mucous membrane to induce a mucous and/or serumal systemic response and/or for protecting the system against infection caused by said antigen. The invention also concerns a vaccine method through a mucous membrane and a method for producing antibodies, in particular, IgA. The invention is particularly applicable for intranasal administration.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une nouvelle utilisation de vésicules multilamellaires à structure en oignon présentant une structure interne cristal-liquide formée d'un empilement de bicouches concentriques à base d'agents amphiphiles alternant avec des couches d'eau, de solution aqueuse ou de solution d'un liquide polaire et au sein desquelles se trouve incorporé au moins un antigène, pour la fabrication d'une composition notamment pharmaceutique et plus particulièrement vaccinale destinée à une administration par voie muqueuse pour induire une réponse muqueuse et/ou systémique sérique et/ou pour protéger l'organisme à l'égard de l'infection dont est responsable ledit antigène. L'invention concerne également un procédé de vaccination par voie muqueuse et un procédé de production d'anticorps, notamment d'IgA. L'invention s'applique tout particulièrement dans le cas d'une administration par voie nasale.

WO 01/19335 A3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/FR 00/02523

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K9/127 A61K9/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BROWNLIE, ROBERT M., ET AL.: "Stimulation of secretory antibodies against Bordetella pertussis antigens in the lungs of mice after oral or intranasal administration of liposome incorporated cell-surface antigens" MICROBIAL PATHOGENESIS, vol. 14, no. 2, February 1993 (1993-02), pages 149-60, XP000920597 Aberdeen (GB)	1-9, 12, 15-19
Y	the whole document	1-9, 12, 15-19
Y	FR 2 769 022 A (CAPSULIS) 2 April 1999 (1999-04-02) cited in the application claims 1-12	1-9, 12, 15-19
	--- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 April 2001

Date of mailing of the international search report

18/04/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ventura Amat, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02523

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>WO 00 37053 A (GENEREX PHARMACEUTICALS) 29 June 2000 (2000-06-29) claims 1,6,26,27 page 12, line 17 -page 13, line 7 -----</p>	<p>1-10,13, 18</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Intern. Application No

PCT/FR 00/02523

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2769022 A	02-04-1999	AU 9169798 A EP 1024830 A WO 9916468 A	23-04-1999 09-08-2000 08-04-1999
WO 0037053 A	29-06-2000	AU 1852000 A	12-07-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema internationale No

PCT/FR 00/02523

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K9/127 A61K9/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BROWNLIE, ROBERT M., ET AL.: "Stimulation of secretory antibodies against Bordetella pertussis antigens in the lungs of mice after oral or intranasal administration of liposome incorporated cell-surface antigens" MICROBIAL PATHOGENESIS, vol. 14, no. 2, février 1993 (1993-02), pages 149-60, XP000920597 Aberdeen (GB)	1-9, 12, 15-19
Y	le document en entier	1-9, 12, 15-19
Y	FR 2 769 022 A (CAPSULIS) 2 avril 1999 (1999-04-02) cité dans la demande revendications 1-12	1-9, 12, 15-19

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 avril 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18/04/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ventura Amat, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema Internationale No
PCT/FR 00/02523

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X, P	<p>WO 00 37053 A (GENEREX PHARMACEUTICALS) 29 juin 2000 (2000-06-29) revendications 1,6,26,27 page 12, ligne 17 -page 13, ligne 7 -----</p>	<p>1-10,13, 18</p>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Déma Internationale No

PCT/FR 00/02523

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2769022 A	02-04-1999	AU 9169798 A	23-04-1999
		EP 1024830 A	09-08-2000
		WO 9916468 A	08-04-1999
WO 0037053 A	29-06-2000	AU 1852000 A	12-07-2000

THIS PAGE BLANK (USPTO)